

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/10, A61K 35/14	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/06705 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Februar 2000 (10.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02309	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 33 476.1 24. Juli 1998 (24.07.98) DE		
(71)(72) Anmelder und Erfinder: HUSS, Ralf [DE/DE]; Alte Holzgasse 4, D-83666 Waakirchen (DE).		
(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: GENETICALLY MODIFIED CD34-NEGATIVE ADHERENTLY GROWING STEM CELLS AND THEIR USE IN GENE THERAPY		
(54) Bezeichnung: GENETISCH MODIFIZIERTE CD34-NEGATIVE, ADHÄRENT WACHSENDE STAMMZELLEN UND DEREN VERWENDUNG IN DER GENTHERAPIE		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to the use of genetically modified, very early haematopoietic and mesenchymal stem cells (negative for the expression of the surface molecule CD34) in the individual gene therapy of mono- or oligogenetic diseases or in cell therapy. Autologous CD34-negative adherently growing stem cell cultures from the peripheral blood of the patient are applied and efficiently transfected or infected with genetic constructs. The gene products of these genes should substitute defective or absent proteins or factors in the patient organism in the long term. After expansion, the autologous stem cells can also be used for cell therapy (organ replacement therapy).</p>		

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von genetisch modifizierten, frühesten hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen (negativ für die Expression des Oberflächenmoleküls CD34) in der individuellen Gentherapie von mono- bzw. oligogenetischen Erkrankungen oder in der Zelltherapie. Dazu werden aus dem peripheren Blut des Patienten körpereigene, CD34-negative, adhären wachsende Stammzellkulturen angelegt und diese mit Genkonstrukten effizient transfiziert bzw. infiziert. Die Genprodukte dieser Gene sollen defekte oder fehlende Proteine bzw. Faktoren im Patientenorganismus langfristig substituieren. Die körpereigenen Stammzellen können nach Expansion auch zur Zelltherapie (Organersatztherapie) verwendet werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GR	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PL	Polen		
CN	China	KZ	Kasachstan	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**GENETISCH MODIFIZIERTE CD34-NEGATIVE, ADHÄRENT
WACHSENDE STAMMZELLEN UND DEREN
VERWENDUNG IN DER GENTHERAPIE**

5

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von genetisch modifizierten, frühesten hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen (negativ für die Expression des Oberflächenmoleküls CD34) in der individuellen Gentherapie von mono- bzw. oligogenetischen Erkrankungen, Erkrankungen der Blutbildung und auch chronischer Leiden. Dazu werden aus dem peripheren Blut des Patienten körpereigene, CD34-negative, adhärent wachsende Stammzellkulturen angelegt und diese mit Genkonstrukten effizient transfiziert bzw. infiziert. Die Genprodukte dieser Gene sollen defekte oder fehlende Proteine bzw. Faktoren im Patientenorganismus langfristig substituieren oder eine Zelltherapie möglich machen.

Das Ziel der somatischen Gentherapie bzw. der Zelltherapie ist der wirksame Transfer von genetischem Material in den Organismus. Bei der somatischen Gentherapie werden genetische Defekte in Körperzellen korrigiert oder Gene, die therapeutisch nützliche Genprodukte kodieren, in Zellen eingeschleust. Die gentherapeutische Veränderung wird dabei nicht an Nachkommen weitervererbt. Das Einschleusen von genetischem Material in Zielzellen kann *ex vivo* als auch *in vivo* vorgenommen werden. *Ex vivo* bedeutet, daß die Zielzellen außerhalb des Körpers kultiviert und nach erfolgter Einschleusung des genetischen Materials anschließend in den Patienten rücküberführt werden. Die Wirksamkeit der somatischen Gentherapie wird jedoch durch eine begrenzte Lebensdauer der transfizierten Zellen beeinträchtigt. Als Zielzellen der somatischen Gentherapie sind daher Zellen mit besonders langer Lebensdauer, wie z.B. hämatopoetische Stammzellen besonders geeignet. Bisher wurden die hämatopoetischen Stammzellen zu Transplantationszwecken entweder aus dem Knochenmark des Spenders oder nach Anreicherungsschritten aus dem peripheren Blut gewonnen. Isoliert man die Zellen aus dem Körper des Patienten oder eines nahen Verwandten, so spricht man von allogenen Knochenmarktransplantationen. Dabei wird häufig das unselektierte Gemisch aus Stammzellen und anderen Knochenmarkzellen in den Patienten rücküberführt.

Die in diesem Gemisch enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen wandern aus dem Blut schließlich in das blutbildende Knochenmark ein, um alle Zellen des blutbildenden Systems in notwendiger Menge zu produzieren. Eine solche Transplantation ist häufig jedoch mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden. Durch noch so geringe Gewebeunterschiede 5 zwischen Empfänger und Spender kann es zu lebensbedrohlichen Komplikationen für den Patienten kommen. Dieses Risiko muß mit der eigentlichen Erkrankung, z.B. Leukämie, aufgewogen werden. Die Spender-Empfänger-Unverträglichkeiten (*graft versus host disease*) werden im allgemeinen durch Zellen verursacht, welche das eigentliche Stammzelltransplantat verunreinigen. Es handelt sich dabei insbesondere um Zellen des Spenderimmunsystems.

10

Um diese Verunreinigung des Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantats auszuschließen, wurden Verfahren entwickelt, um die Population der hämatopoetischen Stammzelle anzureichern. Diese, auch pluripotente hämatopoetische Stammzelle genannt, wird bisher über die Expression bzw. Nicht-Expression bestimmter Oberflächenmoleküle definiert. Die 15 pluripotente hämatopoetische Stammzelle ist in der Lage, über bestimmte weitere Vorläuferzellen, die hämatopoetischen Zelllinien des Menschen zu bilden, z.B. B-Zellen, T-Zellen, Leukozyten, Blutplättchen oder Erythrozyten. Die Bestimmung einer hämatopoetischen Zelle als pluripotente hämatopoetische Stammzelle wird derzeit über die Expression des sogenannten CD34-Moleküls und gleichzeitig über die Nicht-Expression 20 anderer Oberflächenmoleküle wie CD5 bestimmt. Beim CD34-Molekül handelt es sich um ein stark negativ geladenes Proteoglykan der Muzinfamilie mit einem Molekulargewicht von etwa 105 bis 120 kD. Die Firma Cellpro, Inc., Seattle, USA, hat ein Verfahren zur Aufreinigung CD34-positiver Zellen mittels einer Affinitätschromatographie entwickelt (US-PSen 5.215.927, 5.262334, 5.240.856, 5.225.353, EP 526577 B und EP 260280 B). Gleichzeitig 25 bilden CD34-negative Zellen auch den Pool für mesenchymale Stammzellen.

Für die somatische Gentherapie mittels hämatopoetischer Stammzellen werden zur Zeit CD34-positive Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten nach einer Stimulation dieser Zellen mittels Wachstumsfaktoren z.B. G-CSF (Neupogen-R) isoliert, und nach erfolgter genetischer 30 Manipulation dem Patienten zur Rekonstitution des lethal bestrahlten und chemotherapierten Knochenmarks rücküberführt. Bisher werden derart modifizierte hämatopoetische Stammzellen insbesondere für bestimmte Immundefektsyndrome, z.B. Adenosin-Desaminase-

Defekt, SCID-Syndrom oder Infektion mit HIV, für Stoffwechselerkrankungen, z.B. Morbus Gaucher, bei Blutbildungsstörungen, z.B. bestimmte Formen der Thallasämie und bei malignen Erkrankungen, z.B. Leukämien, eingesetzt.

5 Dieses Verfahren bleibt jedoch aus ethisch-sozialen Gründen der autologen bzw. der Blutstammzellspende durch nahe Verwandte vorbehalten, da zur Anreicherung der Stammzellen im peripheren Blut dem Spender bzw. dem Patienten ein Wachstumsfaktor gegeben werden muß, dessen Langzeitwirkung auf eine möglich Expansion eines Leukämie-Klons oder einer möglichen Transformation einer gesunden Blutstammzelle bisher nicht abgeschätzt werden
10 konnte.

Ferner bereitet die somatische Gentherapie mittels hämatopoetischer Stammzellen derzeit noch gewisse technische Schwierigkeiten. Nur ein geringer Teil der mit therapeutischen Genen oder Genkonstrukten transfizierten hämatopoetischen Stammzellen erhält die genetische
15 Modifikation oder es wird kein Genprodukt gebildet. Die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist daher momentan noch sehr gering; vgl. Huss R., *Infusionsthera Transfusionsmed* 23 (1996) 147-160.

Es besteht der Bedarf verbesserte Mittel und Verfahren bereitzustellen, die bei der Gentherapie eingesetzt werden können.
20

Die Aufgabe wird gelöst durch die in den Patentansprüchen 1 bis 8 angegebenen Gegenstände.

Gegenstand der Erfindung sind daher genetisch modifizierte CD34-negative, adhärent wachsende Stammzellen.
25

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Lebenszeit bzw. Teilungsfähigkeit durch transiente Immortalisierung verlängert.

30 Die Erfindung wird durch die Figuren 1 und 2 und die nachfolgende Beschreibung näher erläutert.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die initiale Beobachtung der Existenz von frühesten CD34-negativen hämatopoetischen Stammzellen beruht auf der Isolierung und Klonierung einer entsprechenden Zelllinie aus pri-
5 mären Knochenmarkstromakulturen des Hundes. Diese bestehen aus Fibroblasten-ähnlichen, CD34-negativen Zellen, welche insbesondere in der Lage sind hämatopoetische Wachstumsfaktoren zu produzieren. Die Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren ist bisher schon für stromale Zelllinien beschrieben worden (siehe DE 4322570 C1). Aus einer solchen Primärkultur wurden in einem Standardkolonie-Assay monoklonale Populationen (Colony-forming-units = CFU) etabliert. Einige dieser Klone waren in der Lage in reifere, hämatopoetische Vorläuferzellen zu differenzieren (Huss et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:748-752; 1995). Die Differenzierung und auch die Proliferation dieser Zellen ist abhängig von verschiedenen Wachstumsfaktoren. So induziert Stammzellfaktor (c-kit ligand; SCF) die Differenzierung von CD34-negativen, adhärent wachsenden Zellen in CD34-positive, nicht mehr
10 adhärent wachsende Zellen, während Interleukin-6 (IL-6) in erster Linie die Proliferation und das adhäsente Wachstum unterstützt (Huss et al., *Blood* 85:2414-2421; 1995).

15

Aus CD34-positiven Zellen des peripheren Blutes konnte eine CD34-negative, adhärent wachsende, Fibroblasten-ähnliche Population etabliert werden. Es wurde gefunden, daß der
20 Vorgang der Differenzierung vom CD34-negativen, adhärenten Wachstum zum CD34-positiven, nicht mehr adhärenten Wachstum auch reversibel war. Durch die Zugabe von IL-6 wurde aus peripheren, mononukleären Zellen von gesunden, freiwilligen Spendern eine adhäsente, jedoch zunächst nicht homogene Zellpopulation etabliert. Zu diesem Zweck wurden ca. 20 ml hepariniertes Blut zweifach über einen Ficoll-Gradienten gegeben, die mononukleäre Zell-
25 fraktion nach Standardmethoden isoliert und in IL-6 haltigem Medium in Zellkulturflaschen in einen Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ gegeben. Nach wenigen Tage entstand ein adhäsenter wachsender Zellrasen. Diese Primärkultur bestand zunächst aus den Fibroblasten-ähnlichen Zellen, sowie Makrophagen, Endothelzellen und vereinzelt Fettzellen. Dies wurde mittels Immunphänotypisierung nachgewiesen. Jedoch nahm die Anzahl der "kontaminierenden"
30 Zellen im Verlauf der ersten Tage und Wochen vollständig ab (Huss et al., *Infusionsthera Transfusionsmed* 24:404-409; 1997), bis eine nahezu homogene Zellpopulation entstanden war. Jedoch ist diese Population zu diesem Zeitpunkt nicht klonierbar, da diese nicht immor-

talisiert wurde. Dennoch können diese Zellen entweder in der Zellkultur gehalten oder in üblicher Weise in Flüssigstickstoff eingefroren werden.

Durch Modifikationen der Bedingungen in der Zellkultur können CD34-negative, adhären 5 wachsende Zellen auch in mesenchymale Stammzellen differenzieren, und somit eine Vorläuferzelle für Knochen, Knorpel und andere Gewebe bilden.

Gentransfer

10 Es wurden CD34-negative, adharent wachsende, Fibroblasten-ähnliche Zellen aus aufgereinigten, mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach vorstehendem Verfahren isoliert. Zunächst war die Kontamination mit anderen Zellen sehr hoch, welche jedoch mit der Zeit in Kultur vollständig verschwanden, sodaß 100% der adharenten Zellen als CD34-negative, adharente Zellen vorlagen. Um die Transduktionseffizienz optimal zu gestalten, wurden 15 verschiedene Methoden zum Gentransfer von "green-fluorescence protein" (GFP) untersucht. Beim „green-fluorescence-protein“ handelt es sich um ein Genkonstrukt, welches in transfizierten bzw. infizierten Zellen unter ultraviolettem Licht grün aufleuchtet und so den Nachweis einer mit GFP transfizierten bzw. infizierten Zelle auf einfache Art und Weise ermöglicht.

20 Die Ergebnisse mit in-vitro Kulturen als auch in-vivo Versuche in SCID-Mäusen [-*SCID-Mäuse besitzen einen zellulären Immundefekt, wodurch sich diese Mäuse als in-vivo Modell für allogene oder xenogene Transplantationsmodelle eignen-*] haben gezeigt, daß die Expression von GFP in den Zielzellen viele Wochen andauert, wobei die Fluoreszenz von 25 GFP-transfizierten Zellen in SCID-Mäusen zwar deutlich sichtbar ist, jedoch schwächer ist als im reinen Zellkulturverfahren.

Die Untersuchung verschiedener Transfektions- bzw. Infektionsmethoden für das GFP-Protein erbrachte unterschiedliche Ergebnisse:

30 Die CaCl_2 -Methode zur Transfektion induzierte einen starken Zellstress, sodaß ein großer Teil der zu transfizierenden Zellen abstarben.

Dagegen war die Effizienz des Gentransfers mittels Lipofectamin bzw. Infektion mit viralem Überstand sehr hoch. Während die Transfektionseffizienz mit Lipofectamin nach einmaliger Anwendung bei ca. 40-50% lag, war die Infektionseffizienz mit viralem Überstand nach 10 bis 14 Tagen bei 3-4 Passagen bei 88-94%. Entsprechend wurde alle 3-4 Tage neuer, virus-

5 haltiger Überstand auf die Zielzellen gegeben.

Tabelle:

	% GFP-positiv	Wiederholung	% tote Zellen
Transfektion mit CaCl ₂	68 ± 17	nein	40 ± 21
Transfektion mit Lipofectamin	47 ± 6	nein	< 5
Infektion mit viralem Überstand	91 ± 5	ja	< 1%

10 Effizienz

Der unübersehbare Vorteil des erfindungsgemäßen Systems liegt in der hohen Transfektions- bzw. Infektionseffizienz dieser sehr homogenen, wenn auch meist noch nicht monoklonalen, so doch meistens oligoklonalen Zellpopulation.

15

Während ähnliche Verfahren trotz intensiver Bemühungen bei einer Infektionseffizienz von ca. 5-20% von hämatopoetischen Vorläuferzellen liegen, sind nahezu alle Zellen der erfindungsgemäßen frühen Stammzellpopulation mit dem gewünschten Gen infiziert.

20 Versuche in Zusammenarbeit mit SCID-Mäusen haben gezeigt, daß die Expression des Gens in allen Reihen der Hämatopoiese auch in-vivo erfolgt. Dies gilt nicht nur für retrovirale Konstrukte, sondern auch für die Anwendung Adeno-virus assoziierter Viren (AAV) oder Konstrukte, welche auf dem Epstein-Barr-Virus (EBV) beruhen.

25

Homogenität

Die adhären wachsenden, Fibroblasten-ähnlichen, nahezu homogenen Zellpopulation lassen sich aufgrund der leichten Isolierbarkeit aus peripherem Blut und der hohen Effizienz hervorragend im Bereich der Gentherapie und Zelltherapie einsetzen.

Experimente haben gezeigt, daß diese frühesten hämatopoetischen Stammzellen nicht nur langfristig rekonstituieren können, sondern über die Besiedlung des Thymus auch eine Toleranz induzieren können.

Dies erlaubt eine Anwendung nicht nur im autologen oder syngenen System, sondern auch im Bereich der allogenen Transplantation.

Therapieoptionen

Alle Gene, die im Patienten ein defektes oder nicht vorhandenes Genprodukt repräsentieren, können so durch die Infektion von autologen, hämatopoetischen Zellen mit einem Konstrukt für das fehlende oder defekte Gen dem Patienten mit seinen körpereigenen, genetisch modifizierten Zellen wieder zugeführt werden (siehe Figur 1).

Kandidaten sind insbesondere Gene bei bestimmten metabolischen Stoffwechsel-erkrankungen (z.B. M. Gaucher, PNH, Diabetes mellitus), bei Immundefektsyndromen (ADA-Mangel, SCID, CGD, LAD, AIDS), Hämoglobinopathien (z.B. Sichelzellanämie, Thalassämie) und malignen Erkrankungen (z.B. MDR, Antisense-Konstrukte, Hammerhead-Ribozyme bei identifizierten Mutationen)

[siehe auch Tabelle 1, Seite 8: *Somatic Gene Therapy*; P.L. Chang (ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, USA].

Die vom Patienten isolierten Zellen können nach dem Transfer des gewünschten Gens in die autologen, frühen hämatopoetischen Stammzellen des Patienten auch in Flüssigstickstoff tiefgefroren werden, um sie später bei Bedarf erstmals oder nochmals zu verwenden. Dies ist möglich, da diese Zellen sehr ausgiebig proliferieren.

Ein weitere Ausführungsform betrifft den Einbau eines "Suizid-Gens", z.B. der Thymidin-Kinase, um ggf. mittels Ganciclovir diese infizierten Zellen komplett oder teilweise eliminieren zu können. Dies ermöglicht die Zellen auch in-vivo weiterhin unter einer Wachstumskontrolle 5 zu behalten, z.B. wenn die Aktivität eines Enzyms den gewünschten Serumspiegel übersteigen würde oder die Tumorerkrankung ausgeheilt ist.

Die teilweise transient (oder passager) immortalisierten Stammzellen können auch für eine Zelltherapie oder zur Herstellung von körpereigener Knorpel- bzw. Knochensubstanz 10 verwendet werden (siehe Figur 2).

Bei dieser Ausführungsform ist es ebenfalls nicht nötig, den Patienten einer myeloablativen Therapie zu unterziehen, da der Patient nicht vollständig hämatopoetisch rekonstituiert werden muß, sondern nur ein Teil der hämatopoetischen Stammzellen durch die genetisch modifizierten 15 Stammzellen ersetzt wird.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung

Beispiel 1: Isolierung von Zellen

20

Dem Patienten bzw. freiwilligen Spender werden ca. 20 ml hepariniertes Blut oder Citratblut abgenommen und über einen Ficoll-Hypaque Gradienten (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) geschichtet (siehe auch Huss et al., *Infusionsthera Transfusionsmed* 24:404-409, 1997).

25

Nach 15 - 20 min Zentrifugation bei 400 x g ohne Bremse wird der Ring aus mononukleären Zellen abgenommen und mehrfach in PBS oder isotonischer Kochsalzlösung gewaschen.

Anschließend werden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen / ml in einer Zellkulturflasche (z.B. NUNC) in 30 Zellkulturmedium (z.B. McCoy's Standard Medium mit 12,5% fötalem Kälberserum und 12,5% Pferdeserum) in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in Gegenwart von 10 ng/ml rekombinantem Interleukin-6 (rhu IL-6; RD Systems GmbH, Wiesbaden) inkubiert.

Die Kulturen werden täglich beobachtet und wöchentlich gezählt.

Nach 10-14 Tagen entsteht eine homogene Zellpopulation aus adhärent wachsenden, Fibroblasten-ähnlichen Zellen, welche bei der Analyse im FACScan bzw. in der Immunhistochemie nahezu vollständig CD34-negativ sind. Einige, differenzierende Zellen exprimieren zeitweise dennoch das CD34-Antigen, da diese Zellen nicht synchronisiert sind.

Beispiel 2: Retrovirale Infektion / am Beispiel der Infektion mit EBV-Konstrukten

Diese oben beschriebene homogene Zellpopulation wird nun mit retroviralem Überstand der PG-13 Zelllinie (*Eine Verpackungszellline, welche den gewünschten retroviralen Vektor nach Transfektion der PG-13 Zellen in eine Gibbonaffen-Leukämievirushülle verpackt. Die Transfektion der Verpackungszelllinie geschieht indem 2,5 µg Plamid-DNA mit 15 µl Superfect (Qiagen) gemischt werden und in 100 µl Serum-freiem Medium bei Raum-Temperatur für 20 Minuten inkubiert werden. Anschließend wird diese Mischung für 5 Stunden bei 37°C mit den PG-13 Zellen inkubiert, bevor erneut Serum-haltiges Medium zugegeben wird.*) über einen Zeitraum von ebenfalls 10-14 Tagen inkubiert, wobei das Virus-haltige Medium mindestens 3-4 mal gewechselt werden sollte. Nach dieser Zeit wird die Genexpression (bei GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie) in den Zielzellen untersucht und die Effizienz festgestellt.

Die positiven Zellen können nun dem Patienten zurückgegeben oder für einen späteren Gebrauch eingefroren werden. Bei diesen retrovirusalen Infektionen liegt die MOI (*Multiplicity of Infection = wieviel Viruspartikel sind für die Infektion einer Zelle erforderlich*) bei 10.

Die Zellen können auch transient immortalisiert werden, um eine Expansion der Stammzellen zu erreichen.

Beispiel 3: Infektion der aus dem Patienten isolierten Zielzellen mit rekombinantem AAV-Virus, welcher Luziferase exprimiert

Die aus dem Patienten isolierten Zielzellen konnten sehr effizient ebenfalls mit rekombinantem
5 AAV-Virus infiziert werden, welcher Luziferase exprimiert. Die Zielzellen des Patienten wurden für 3 Stunden bei 37°C mit LUC-rAAV inkubiert und anschließend für weitere 72 Stunden in Serum-haltigem Medium gehalten. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität als auch die Lumineszenz gemessen. In diesem System liegt die MOI bei 1000.

10 Beispiel 4: Patientenbeispiel 1

Die Vorgehensweise ist schematisch in Figur 1 dargestellt.

Dem Patienten A mit dem Gendefekt X wird aus der Armvene Blut entnommen und aus diesem periphere mononukleäre Zellen mittels Gradientenzentrifugation isoliert. Diese mononukleären Zellen werden in der Zellkultur mit Interleukin-6 inkubiert bis sich ein adhärenter Zellrasen etabliert hat.
15

In der primären Kultur ist die Kontamination mit nicht hämatopoetischen Stammzellen noch
20 sehr hoch. Nach 2-4 Wochen sind nahezu ausschließlich CD34-negative, hämatopoetische Stammzellen ausgewachsen, welche nun expandiert werden können.

Diese werden nun mit retroviralen Viruskonstrukten oder AAV-Viren, welche zuvor mit dem gewünschten Genkonstrukt transfiziert worden waren, infiziert. Nach wenigen Tagen kann in
25 den hämatopoetischen Stammzellen des Patienten A nun die Gegenwart des Gens X und die Expression des Genproduktes X (z.B. Glucocerebrosidase oder Insulin) nachgewiesen werden.

Nun erhält der Patient A seine genetisch modifizierten, frühen hämatopoetischen Stammzellen
30 über eine Infusion zurück, wobei ein Teil dieser Zellen zur späteren Verwendung in Flüssigkeitssickstoff konserviert wird. Die nun mit einer neuen genetischen Information versehenen Blutz-

stammzellen des Patienten versorgen den Patienten A nun mit dem für ihn wichtigen Genprodukt X.

Im Falle des Diabetes mellitus wird es schon reichen einen ganz geringen Prozentsatz der 5 körpereigenen Stammzellen mit dem neuen genetischen Material zu versehen, um den Blutzuckerspiegel langfristig zu senken und damit ebenfalls den notwendigen Insulinbedarf. Dies würde bei Diabetespatienten sicherlich auch die schweren Beleiterkrankungen langfristig verzögern oder gar verhindern.

10 Beispiel 5: Patientenbeispiel 2

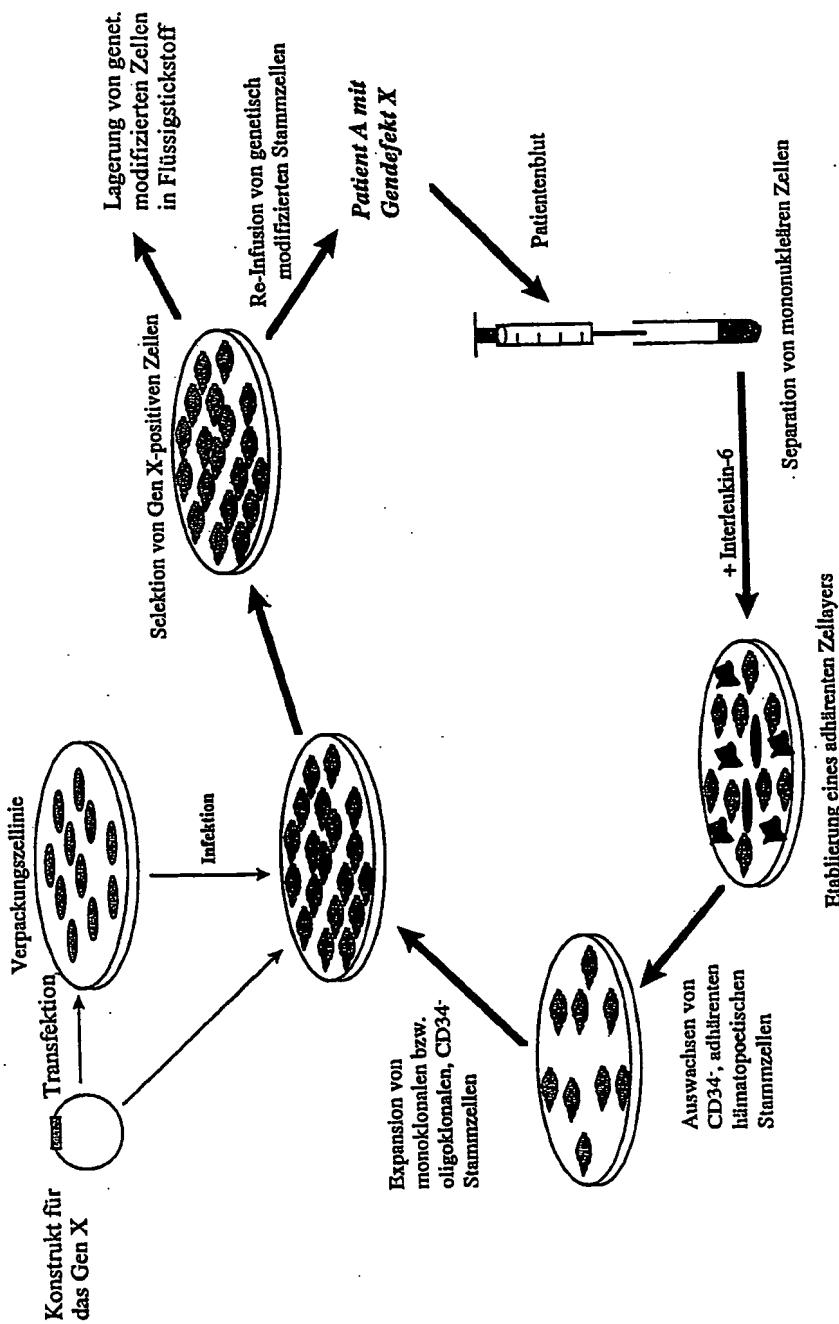
Patent B leidet an einem schweren Knorpeldefekt im Kniegelenk. Dem Patienten werden periphere Blutstammzellen entnommen (z.B. durch Apherese) und transiert (passager) immortalisiert (z.B. durch SV40- Large-T Antigen in einem cre/lox-System mit EBNA1).
15 Diese Zellen werden dann in der Zellkultur in Knorpel-/ Knochenvorläuferzellen differenziert und an die defekte Stelle transplantiert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhären wachsende Stammzellen.
- 5 2. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhären wachsende Stammzellen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein retrovirales Konstrukt oder ein EBV-Konstrukt oder ein Adenovirus-assoziiertes Konstrukt enthalten.
- 10 3. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhären wachsende Stammzellen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das retrovirale Konstrukt oder das EBV-Konstrukt oder das Adenovirus-assoziiertes Konstrukt ein therapeutisches Gen trägt.
- 15 4. Genetisch modifizierte CD34-negative, adhären wachsende Stammzellen gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das therapeutische Gen codiert für Insulin, Faktor VIII, Adenindesaminase, Multidrug-Resistance (MDR) oder einen Immortalisierungsfaktor.
- 20 5. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen adhären wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 als Arzneimittel.
- 25 6. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen adhären wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur individuellen Gentherapie bei mono- bzw. oligogenetischen Erkrankungen.
- 30 7. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen adhären wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur individuellen Gentherapie bei einem Immundefektsyndrom, einer Stoffwechselerkrankung, bei Blutbildungsstörungen und bei malignen Erkrankungen.

8. Verwendung von genetisch modifizierten CD34-negativen, adhärent wachsenden Stammzellen gemäß einem der Ansprüche 1-4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur individuellen Zelltherapie mittels mesenchymaler oder hämatopoetischer Stammzellen.

Figur 1



Figur 2